

# Evaluasi Tanaman Kedelai Generasi R1 Hasil Transformasi dengan Gen *Proteinase Inhibitor II*

Muhammad Herman, S.J. Pardal, E. Listanto, T.I.R. Utami, dan D. Damayanti

*Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor*

## ABSTRAK

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rekayasa Genetik serta rumah kaca terbatas (FUT) Kelti Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor pada tahun anggaran 2000. Penelitian terdiri dari dua kegiatan, yaitu (1) bioasai tanaman kedelai transgenik R1 terhadap *Etiella zinckenella* Treit. dan (2) analisis molekuler gen *pinII* pada tanaman ke-delai R1 hasil transformasi. Penelitian bertujuan untuk mengetahui keberadaan dan ekspresi gen *pinII* pada tanaman kedelai generasi R1 hasil transformasi. Satu *event* tanaman hasil transformasi melalui *Agrobacterium* yang mengandung gen *pinII* telah diperoleh, yaitu AT1 (varietas Tidar) dan lima *event* tanam-an hasil transformasi melalui penembakan dengan gen *pinII*, yaitu dua dari varietas Wilis (WP1 dan WP2) dan tiga dari varietas Tidar (TP1, TP2, TP3). Semua *event* tanaman ini fertil kecuali TP3 dan selanjutnya biji/benih ditanam kembali untuk keperluan pengujian bioasai dan molekuler. Pengujian bioasai tanaman kedelai hasil transformasi terhadap larva *E. zinckenella* Treit. juga telah dilakukan. Beberapa individu yang diuji (khususnya WP1 dan AT1) memiliki ketahanan terhadap hama ini yang ditunjukkan dengan rendahnya tingkat kerusakan pada polong/biji. Biji yang sehat selanjutnya dikoleksi untuk pengujian lebih lanjut. Pada kegiatan analisis molekuler, telah berhasil diisolasi DNA total dari semua individu R1 pada semua *event* menggunakan sampel daun muda dengan metode modifikasi *Saghai-Maroo* (CTAB). DNA sampel yang telah dimurnikan selanjutnya digunakan untuk deteksi gen *pinII* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik untuk gen *pinII*. Hasil *check* PCR menunjukkan adanya beberapa sampel positif gen *pinII*, yaitu pada pita berukuran 600 bp, di antaranya AT1-7, AT1-11, AT1-21, AT1-22, AT1-25, dan WP2. Benih tanaman yang PCR positif akan diteruskan untuk analisis generasi berikutnya.

**Kata kunci:** Evaluasi, kedelai R1, transformasi, gen *proteinase inhibitor II*, analisis molekuler, bioasai

## ABSTRACT

Research was conducted at Molecular Biology and Genetic Engineering Laboratory and Biosafety Containment of Research Institute for Food Crop Biotechnology Bogor in 2000. Researchs were divided into two activities, i.e (1) bioassay of R1 transgenic soybean plants for pod borer (*Etiella zinckenella* Treit.) and (2) molecular analysis of molecular analysis of *pinII* gene on R1 transgenic soybean plants. The objectives were to detect the *pinII* gene and its expression on R1 transformed soybean plants. One event plant was obtained from the *Agrobacterium*-mediated transformation coded AT1 (cv. Tidar), while five event plants were obtained from the particle bombardment transformation coded WP1 and WP2 (cv. Wilis) and TP1, TP2, TP3 (cv. Tidar). Those plants were all fertile except TP3. And then those seeds were cultivated for bioassay and molecular analysis of R1 plants. Bioassay of R1 transformed soybean was conducted using neonate larvae of *E. zinckenella* Treit. Some plants were resistant to this pest. It proved by the low pod/seed damages. The healthy seeds were then collected for further analysis. On the

molecular analysis, total genome DNA of R1 transformed soybean plants were extracted from the young leaf samples. These DNA samples were then used for the *pinII* gene detection using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with specific primers for the *pinII* gene. PCR result indicated that some samples were positive, i.e. AT1-7, AT1-11, AT1-21, AT1-22, AT1-25, and WP2. Seed from the positive event were collected for further analysis.

**Key words:** Evaluation, R1 soybean plants, transformation, proteinase inhi-bitor II gene, molecular analysis, bioassay

## PENDAHULUAN

Penggunaan kultivar kedelai tahan hama merupakan cara yang efisien dan ramah lingkungan di dalam program pengendalian hama tanaman. Penggunaan kultivar tahan dapat mengurangi aplikasi pestisida sehingga dapat menghemat biaya produksi dan mengurangi bahaya residu pestisida yang sering ditimbulkan oleh bahan aktif pestisida. Pada sistem pertanian yang berkelanjutan, cara inilah yang sangat sesuai (Sticklen, 1990; Soekarna dan Harnoto, 1985; Asano *et al.*, 1991).

Kemajuan teknologi pertanian, khususnya bidang bioteknologi memberi peluang untuk merakit kultivar tanaman tahan sifat tertentu melalui rekayasa gene-tika (Greenberg dan Glick, 1993; Herman, 1996). Beberapa gen ketahanan terha-dap sifat tertentu, seperti gen *cry* (Cheng *et al.*, 1992) serta *khitinase* dan *proteinase inhibitor* (Ryan, 1990) sudah berhasil diisolasi dan bahkan telah digunakan untuk transformasi genetik tanaman sehingga diperoleh tanaman transgenik yang tahan terhadap sifat tertentu (Gatehouse *et al.*, 1991; Sticklen, 1990).

Gen *proteinase inhibitor* (*pin*) merupakan gen yang dapat menghambat proses pencernaan protein di dalam perut serangga (Ryan, 1990). Gen ini dapat digu-nakan untuk membuat tanaman tahan terhadap serangga hama, di samping gen *cry* (Bt) yang sudah banyak digunakan (Cheng *et al.*, 1992). Apabila gen ini ditrans-fer ke dalam kromosom tanaman dan mampu diekspresikan, maka serangga yang memakan daun tanaman transgenik tersebut akan terganggu sistem pencernaan-nya, terhambat pertumbuhannya, dan akhirnya mati jika tingkat penghambatan pencernaan proteinnya tinggi (Ryan, 1990; Jhonson *et al.*, 1990).

Supaya gen asing dapat berfungsi, maka gen tersebut harus dimodifikasi ter-lebih dahulu secara molekuler (Greenberg dan Glick, 1993). Gen asing yang akan diintroduksi ke genom tanaman harus memiliki daerah pengaturan (*regulatory region*) dan gen pelapor (*reporter gene*), sehingga gen tersebut dapat terintegrasi di dalam genom tanaman dan dapat diekspresikan dengan baik/sempurna (Sticklen, 1990; Herman, 1997). Gen yang telah dikonstruksi ini harus dijadikan suatu vektor plasmid agar dapat dipindahkan ke sel tanaman melalui penembakan (*particle bombardment*) atau disambungkan ke plasmid vektor pada *Agrobacterium* (Grimsley dan Bisaro, 1987).

Proses suatu transfer gen asing ke dalam genom suatu tanaman target dimulai dengan pemasukan gen asing ke dalam sitoplasma sel tanaman target. Selanjutnya gen ini akan masuk ke dalam inti sel tanaman melalui pori-pori membran inti sel. Apabila gen asing tersebut berhasil masuk atau menyisip ke dalam kromosom tanaman target dan berintegrasi dengan baik (berada pada bagian yang aktif ditranskripsi), maka gen itu akan dapat diekspresikan oleh tanaman transforman.

Tahapan penting untuk mengetahui keberhasilan suatu proses transfer gen asing ke dalam genom suatu tanaman target melalui analisis secara molekuler. Analisis molekuler dapat dilakukan pada tahap transisi (*transient*) di mana gen/ DNA asing belum terintegrasi dalam kromosom tanaman target (Lonsdale *et al.*, 1990) atau pada tahap stabil (*stable transformant*) di mana gen/DNA asing telah terintegrasi dalam kromosom tanaman target (McCabe *et al.*, 1988).

Teknik molekuler yang biasa digunakan untuk deteksi gen asing pada tanaman hasil transformasi genetika adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau dengan hibridisasi *Southern Blot*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu gen sisipan pada tanaman hasil transformasi (Mc Garvey dan Kaper, 1991). Teknik ini sangat praktis dan mudah dilakukan, karena hanya membutuhkan jumlah DNA yang sedikit sehingga tes PCR terhadap tanaman transgenik dapat dilakukan secara dini, yaitu pada tahap kalus atau planlet (Listanto *et al.*, 1996). Sedangkan hibridisasi *Southern Blot* (Sambrook *et al.*, 1989) relatif lebih lama dan mahal pelaksanaannya, karena membutuhkan sampel DNA yang banyak, bahan kimia yang mahal, dan proses yang panjang. Tetapi dengan analisis ini dapat diketahui pola integrasi dan jumlah kopi gen asing yang disisipkan (Hadi *et al.*, 1996).

Bioasai terhadap hama target merupakan uji umum untuk mengetahui ekspresi suatu gen asing/*insert* pada tanaman hasil transformasi genetika. Biasanya digunakan sejumlah sampel daun/batang/polong dari tanaman yang diuji lalu diinfeksi dengan sejumlah larva target. Ekspresi suatu gen dikatakan baik jika persentase kematian larva tinggi, tingkat kerusakan rendah/tidak, ada dan pertumbuhan larva target tetap/terhambat. Hasil bioasai ini masih perlu diyakinkan lagi dengan uji secara molekuler, yaitu dengan metode *Western Blot*. Uji ini dapat digunakan untuk memastikan ada dan tidaknya protein produk dari suatu gen *insert* pada jaringan atau tanaman hasil transformasi genetika (Sambrook *et al.*, 1989).

Pada penelitian ini akan dilakukan evaluasi tanaman kedelai R1 hasil transformasi dengan gen *pinII* baik secara molekuler maupun bioasai terhadap larva hama penggerek polong kedelai (*Etiella zinckenella* Treit.).

## BAHAN DAN METODE

## **Bioasai Tanaman Kedelai Transgenik R1 terhadap Penggerek Polong**

Penelitian dimulai pada tahun anggaran 2000 di Laboratorium Fasilitas Uji Terbatas, Kelti Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen *pinII* pada tanaman kedelai transgenik putatif generasi R1 baik hasil penembakan maupun infeksi *Agrobacterium*.

### **Perbanyak Serangga**

Serangga *E. zinckenella* Treit. dikoleksi di dua lokasi pertanaman kedelai, yaitu Malang dan Lampung kemudian serangga tersebut dipelihara dan diperbanyak di laboratorium serangga di dalam Fasilitas Uji Terbatas (FUT) Balitbio. Telur selanjutnya diinfestasikan pada polong kedelai muda dan dibiarkan menetas. Setelah 3-4 hari akan menjadi larva di dalam petridish. Stadia larva terdiri dari 5 instar berkisar 13-18 hari. Larva instar lima dipindahkan dalam serbuk gergaji halus dan akan membentuk pupa di dalam rumah kepompong serbuk gergaji. Stadia pupa berkisar antara 9-15 hari dan akan muncul imago. Imago dipindahkan ke dalam kurungan kasa yang telah diberi polong kedelai yang digantungkan dalam kurungan sebagai media untuk bertelur. Masa pertumbuhan telur sampai imago berkisar antara 28-41 hari dengan rata-rata 35 hari (Tengkano dan Suhardjan, 1985).

### **Infestasi Larva *E. zinckenella* Treit. pada Polong Kedelai**

Polong kedelai berumur 60 hari setelah tanam disampling dari tanaman dan dimasukkan ke dalam petridish yang telah diisi kertas saring yang ditetesi dengan akuades. Setiap *event* tanaman dipilih 10 polong. Setiap polong diinfestasi dengan 1-3 ekor larva *Etiella* yang baru menetas (*neonate*). Infestasi dilakukan dengan menggunakan kuas kecil. Selanjutnya polong ditutup dengan kantong plastik kecil yang diberi lubang-lubang dan diberi kode/label. Pengamatan dilakukan setelah polong/biji dipanen. Parameter yang diamati meliputi serangan larva pada polong dan biji dengan menghitung jumlah lubang gergaji pada polong dan biji, jumlah biji sehat, dan jumlah imago yang ada.

### **Analisis Molekuler Gen *pinII* pada Tanaman Kedelai Transgenik R1**

#### **Ekstraksi DNA (Modifikasi Metode CTAB)**

DNA diekstrak dari daun tanaman kedelai transgenik R1 yang telah ditanam di rumah kaca. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggerus kurang lebih 0,5-2 g daun yang telah disimpan dalam ruang gelap bersuhu -20°C dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk halus. Kemudian serbuk daun tersebut dipindahkan ke dalam tabung corning dan ditambah dengan bufer ekstraksi [50 mM Tris HCl (pH 7,4); 25 mM EDTA 9 (pH 8), 300 mM NaCl; 1% CTAB]. Campuran tersebut kemudian digoyang perlahan dan disimpan pada *waterbath* 65°C, selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang

selama 4-6 menit, ekstraksi kemudian dilanjutkan dengan menambahkan 6 ml kloroform dan isoamilalkohol dengan perbandingan 24 : 1. Campuran tersebut digoyang kembali selama 20 menit. Setelah supernatan akhir dipisahkan, campuran ditambah 2 vol 95% ETOH dingin. Setelah dicampur merata, pelet DNA diambil dengan pipet pasteur dan dipindahkan ke dalam eppendorf 1,5 ml. Endapan DNA dicuci dengan alkohol 70% dingin (2 kali), kemudian dikeringkan dengan mesin evaporator VWR 1410. Endapan DNA kemudian dilarutkan dalam 1 x TE buffer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8). Purifikasi DNA pelet yang diperoleh, dilakukan dengan menambahkan 3 µl RNase dan 3 ml proteinase K (1 mg/ml) 37°C, 60 menit. Kemudian tambahkan 1/10 vol 3 M NaOAc. Tambahkan 2 vol ETOH absolut, dicampur merata. Pelet DNA dipindahkan ke eppendorf baru, kemudian dicuci dengan ETOH 70% (v/v), selanjutnya dikeringkan dan dilarutkan dalam TE (1 kali) dan disimpan dalam suhu -20°C.

### **Proses PCR dan Analisis Hasil PCR**

DNA tanaman kedelai hasil transformasi gen *pinII* melalui *particle bombardment* yang telah diekstrak, kemudian digunakan untuk analisis PCR. Reaksi PCR dilakukan dalam total bufer PCR, yang terdiri atas 5 ng DNA dari tanaman sampel dan kontrol; 100 nM masing-masing primer; 200 µM dNTP dan 1,5 µl enzim *Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), menggunakan mesin PCR *Programable Thermal Controller (MJ Research Incorporation, Massachusetts, USA)* dalam 35 siklus yang terdiri 94°C, 5 menit, 94°C, 1 menit, 55°C selama 2 menit dan 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi PCR ini kemudian dipisahkan dengan 0,8% (w/v) elektroforesis agarose gel dan pewarnaan dengan *ethidium bromide*.

Parameter pengamatan dilakukan berdasarkan ada tidaknya pita DNA untuk gen *pinII* pada foto gel hasil elektroforesis yang berukuran lebih kurang 600 bp (*check PCR*).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Bioasai Tanaman Kedelai Transgenik R1 terhadap Penggerek Polong Perbanyak Serangga Hama *E. zinckenella* Treit.**

Pemeliharaan dan perbanyak (*rearing*) serangga hama *E. zinckenella* Treit. yang diperoleh dari lapang (Malang dan Lampung) telah berhasil dilakukan di laboratorium FUT, Balitbio, Bogor. Telur, larva, pupa, dan imago dari *E. zinckenella* Treit. dapat dihasilkan dengan baik sehingga dapat digunakan untuk pengujian bioasai tanaman kedelai transgenik setiap saat.

### **Pengujian Bioasai Tanaman Kedelai Transgenik terhadap Larva *E. zinckenella* di Rumah Kaca Terbatas (FUT)**

Sebanyak 49 tanaman dari *event* WP1 (varietas Wilis) telah dibioasai dan memberikan hasil persentase polong terserang 37,7-79,2%, biji terserang 34,8-100%, dan biji sehat 26,1-65,2%. Satu tanaman dari *event* TP1 dan empat tanaman dari *event* TP2 (varietas Tidar) juga telah dibioasai dan memberikan persentase polong terserang 64,9-100%, biji terserang 47,8-77%, dan biji sehat 28,8-52,2%. Sedangkan dari *event* AT1 (varietas Tidar) telah diuji sebanyak 30 tanaman dan memberikan hasil persentase polong terserang 33,3-76,6%, biji terserang 64-100%, dan biji sehat 0-36,9%. Dibandingkan dengan tanaman kontrol menunjukkan bahwa tanaman transgenik yang diuji relatif lebih tahan terhadap serangan larva penggerek polong. Kontrol Tidar memberikan persentase polong terserang 95,5%, biji terserang 80,3%, dan biji sehat 19,7% dari 10 tanaman yang diuji. Sedangkan kontrol Wilis memberikan persentase polong terserang 96,5%, biji terserang 81,11%, dan biji sehat 18,9% (Tabel 1). Hasil bioasai terhadap polong kedelai transforman dan nontransforman dengan larva *Etiella* sp. menunjukkan bahwa larva *E. zinckenella* Treit. tumbuh subur dan selera makannya tidak terganggu pada polong kedelai nontransforman (kontrol). Sedangkan pada polong kedelai transforman, larva *E. zinckenella* Treit. tidak sempat menggerek polong dan masuk ke dalam biji kedelai transforman yang diuji (polong dan biji terlihat utuh). Namun pada tanaman generasi R1 ini terlihat adanya variasi ketahanan yang cukup besar. Hasil pengamatan bioasai secara lengkap disajikan pada Tabel 1. Ekspresi gen *pinII* yang baik ditunjukkan dengan adanya persentase polong dan biji terserang yang rendah dan persentase biji sehat yang tinggi. Pada pengujian bioasai ini, persentase polong terserang terendah untuk *event* WP1 terdapat pada individu WP1-47 (37,7%), sedangkan untuk *event* TP1 adalah TP1-1 (64,9%) dan untuk *event* AT1 adalah AT1-8 (33,3%). Persentase biji terserang terendah untuk *event* WP1 adalah WP1-9 (34,8%), *event* TP adalah TP1-1 (47,8%), dan *event* AT1 adalah AT1-26 (64%). Persentase biji sehat tertinggi untuk *event* WP1 adalah WP1-9 (65,2%), *event* TP adalah TP2-4 (52,2%), dan *event* AT1 adalah AT1-4 (36,9%). Untuk pengujian ketahanan lebih lanjut, biji yang sehat dipisahkan, dikeringkan, dan ditanam kembali di rumah kaca terbatas.

**Tabel 1.** Ketahanan polong kedelai transgenik R1 terhadap larva *E. zinckenella* Treit. Balitbio, 2000

<i>Event</i> tanaman	Jumlah tanaman	Jumlah sampel	Polong terserang (%)	Biji terserang (%)	Biji sehat (%)	Jumlah imago (ekor)
WP1	49	10	37,7-79,2 (66,1)*	34,8-100 (73,9)*	26,1-65,2 (26,1)*	2,00
TP1 & TP2	5	10	64,9-100 (58,9)*	47,8-77,0 (84,9)*	28,8-52,2 (15,0)*	0,80
AT1	30	20	33,3-76,6 (58,9)*	64-100 (84,9)*	0-36,9 (15,0)*	1,26
Wilis	10	10	50,8-98,3 (96,5)*	52,4-100 (81,1)*	0-47,6 (18,9)*	2,30
Tidar	10	10	50,9-79,3 (95,5)*	53,9-96 (80,3)*	4-46,2 (19,7)*	1,67

WP1 = *event* pertama penembakan dari varietas Wilis, TP1 dan TP2 = *event* 1 dan 2 penembakan dari varietas Tidar, AT1 = *event* pertama *Agrobacterium* dari varietas Tidar, Wilis = tanaman kontrol (non-transformasi) varietas Wilis, Tidar = tanaman kontrol (nontransformasi) varietas Tidar, \* = nilai persentase rata-rata

**Tabel 2.** Hasil deteksi gen *pinII* tanaman kedelai transgenik R1 dengan teknik PCR

Event tanaman	Generasi tanaman	Metode transformasi	Jumlah sampel	Hasil PCR
WP1	R1	Penembakan	20	?
WP2	R <sub>0</sub>	Penembakan	1	Positif
TP1	R1	Penembakan	4	?
TP2	R1	Penembakan	1	?
AT1	R1	<i>Agrobacterium</i>	40	Positif dan negatif
Wilis	Kontrol	Non transformasi	1	Negatif
Tidar	Kontrol	Non transformasi	1	Negatif

Positif = ada pita DNA *pinII* (600 kb), negatif = tidak ada pita DNA *pinII*, positif dan negatif = ada beberapa sampel positif *pinII* (No. 7, 11, 21, 22, 25), ? = hasil masih meragukan (belum konsisten)

### Analisis Molekuler Gen *pinII* pada Tanaman Kedelai Transgenik R1

#### Isolasi DNA Total Genom Kedelai Transgenik R1

DNA total genom berhasil diisolasi dengan baik dari sampel daun tanaman kedelai transgenik R1 dan nontransgenik. Hal ini ditunjukkan dengan hasil kemurnian DNA yang telah memenuhi syarat, yaitu berkisar 0,5-2,7. Kemurnian DNA yang baik untuk uji molekuler berkisar antara 1,6-1,8. Sampel DNA yang diekstrak dari daun tanaman kedelai ini selanjutnya diseparasi di agarose gel elektroforesis 0,8% dan difoto dengan film polaroid. Dari hasil foto gel terlihat bahwa DNA semua sampel dapat muncul/terdeteksi. Berdasarkan foto gel hasil isolasi DNA seluruh sampel tanaman kedelai transgenik tampak bagus. Sampel DNA ini selanjutnya digunakan untuk deteksi gen *pinII* menggunakan teknik PCR.

#### Deteksi Gen *pinII* dengan Teknik PCR

Deteksi gen *pinII* dengan teknik PCR telah dilakukan terhadap semua sampel DNA tanaman kedelai transgenik R1 dan tanaman kontrol menggunakan primer spesifik untuk gen *pinII*. Setelah selesai proses PCR (amplifikasi segmen DNA *pinII*) selanjutnya dilakukan pengecekan produk PCR dengan proses elektroforesis pada agarose gel 1%. Dari foto gel elektroforesis hasil PCR menunjukkan adanya beberapa sampel positif mengandung gen *pinII*, khususnya pada event AT1 (AT<sub>1-7</sub>, AT<sub>1-11</sub>, AT<sub>1-21</sub>, AT<sub>1-22</sub>, AT<sub>1-25</sub>) dan juga satu sampel dari event WP2 (tanaman R<sub>0</sub> hasil penembakan) (Tabel 2). Namun hasil PCR ini masih belum konsisten, karena kadang muncul (positif) kadang tidak muncul setelah diulang lagi sehingga masih diperlukan optimasi prosedur PCRnya.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil tiga kegiatan penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil pengamatan terhadap polong yang diinfestasi dengan *E. zinckenella* menunjukkan bahwa keempat *event* transformasi memberikan ketahanan yang bervariasi. Bahkan individu dalam satu *event* transformasi juga memberikan variasi ketahanan.
2. Hasil deteksi DNA terhadap ada tidaknya gen *pinII* dengan teknik PCR menunjukkan bahwa beberapa sampel tanaman memberikan hasil positif, yaitu dari *event* AT1 (No. 7, 11, 21, 22, dan 25). Sedangkan *event* lainnya masih belum konsisten hasilnya (kadang positif, kadang negatif).

### Saran

Kegiatan evaluasi tanaman kedelai transgenik baik secara bioasai maupun molekuler masih perlu dilakukan lagi pada generasi tanaman selanjutnya untuk meyakinkan hasil evaluasi/uji sebelumnya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Asano, Y., Y. Otsuki, and R.L. Meeusun. 1991.** Insect control with genetically engineered crops. *Tibtech*. 9:197-200.
- Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena, and M.B. Sticklen. 1992.** Production of insect resistant potato by genetic transformation with a 3-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Sci*. 1:83-91.
- Gatehouse, J.A., V.A. Hilder, and A.M.R. Gatehouse. 1991.** Genetic engineering of plants for insect resistance. *In* Gierson, D. (*Ed.*). *Plant Genetic Engineering*. Chapman and Hall, Inc. New York. p. 105-135.
- Greenberg, B.M. and B.R. Glick. 1993.** The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. *In* Gierson, D. (*Ed.*). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Inc. New York. p. 1-10.
- Grimsley, N. and D. Bisaro, 1987.** Agroinfection. *In* Hohn Th. and J. Schell (*Eds.*). *Plant DNA Infectious Agents*. Springer-Verlag, Wien, New York. p. 87-107.
- Hadi, M.Z., M.D. Mc Mullen, and J.J. Finer. 1996.** Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Report* (15):500-505.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *AgroBio* 1(1):24-34.
- Herman, M. 1997.** Insect resistant plants via genetic engineering. The proceeding of Conference of Agricultural Biotechnology II. Jakarta, June 13-15, 1995. *In press*.

- Jhonson, R., G.J. Narvaez, and C.A. Ryan, 1990.** Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defence against *Mandusa sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9871-9875.
- Listanto, E., S.J. Pardal, and Kan Wang, 1996.** A simple method of DNA isolation from transgenic maize plant for polymerase chain reaction. Indonesian Journal of Agricultural Biotechnology 1(1):33-38.
- Lonsdale, D., S. Onde, and A. Cumming. 1990.** Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. J. Exp. Bot. (41):1161-1165.
- Mc Cabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, and P. Christou. 1988.** Stable transformation of soybean (*Glycine max* L.) by particle acceleration. Bio/Technology 6:923-926.
- Mc Garvey, P. and J.M. Kaper. 1991.** A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. Biotechniques 11(4):428-432.
- Ryan, C.A. 1990.** *Proteinase inhibitors* in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 28:425-449.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989.** Molecular cloning, a laboratory manual second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, and 3.
- Soekarna, D. dan Harnoto. 1985.** Pengendalian hama kedelai. *Dalam* Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. 508 hlm.
- Sticklen, M.B. 1990.** Genetic engineering of plants: An alternative pesticides and a new component of integrated pest management. *In* Weigmann, D.L. (Ed). Pesticides in the Next Decade: The Challenges Ahead. VPI Publ. Blacksburg. VA. p. 552-566.
- Tengkano, W. dan M. Suhardjan. 1985.** Jenis hama utama pada berbagai fase pertumbuhan tanaman kedelai. *Dalam* Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. 508 hlm.